ミニ・レビュー —小西賞受賞者—

心筋型リアノジン受容体構造安定化による新しい心不全治療

小林茂樹

山口大学医学部 高齢者心不全治療学講座 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)

Key words : Heart failure, Arrhythmia, Ryanodine receptor, Dantrolene

抄 録

心不全時には、心筋細胞内Ca²⁺貯蔵庫である筋小胞体 (SR) 膜上に存在する心筋型リアノジン受容体 (RyR2) から拡張期Ca²⁺漏出が生じ、このことによりSR内Ca²⁺枯渇や細胞内Ca²⁺過負荷が生じる。その結果、心筋細胞機能が障害され、収縮・拡張不全やトリガードアクティビティの機序で致死的不整脈が引き起こされる。近年、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析により、RyR2の微細構造が解明され、RyR2四量体構造の不安定化が拡張期Ca²⁺漏出の原因であることが明らかになってきた。カテコラミン誘発性多形性心室頻拍 (CPVT) では、RyR2の1アミノ酸変異により、N末端ドメイン (1-220) と中央ドメイン (2300-2500) 間に連関障害 (unzipping) が引き起こされる。また、横行大動脈縮窄 (TAC) 心不全モデルや心筋梗塞 (MI) 心不全モデルでは、心筋細胞内に活性酸素種 (ROS) が生じ、そのROSが、RyR2を酸化することにより、unzippingが生じ、RyR2からカルモジュリン (CaM) の解離と拡張期Ca²⁺漏出を引き起こす。その結果、左室リモデリングや致死的不整脈が惹起され、TACモデル、MIモデルともに生存率が著明に低下する。しかしながら、ダントロレンは、これらのどのモデルに対してもRyR2のN末端ドメイン (1-220) と中央ドメイン (2300-2500) で形成されるドメインスイッチに直接結合し、RyR2四量体の構造を安定化し、拡張期Ca²⁺漏出を抑制する。最近、

III群抗不整脈薬抵抗性のヒト心不全に合併した心室頻拍 (VT) ストームに対しても、ダントロレン静注は、VTストームの停止や予防に有効であることを報告した。現在、臨床応用のために、慢性心不全に対するダントロレンの予後改善効果を明らかにするためのランダム化二重盲検試験 (SHO-IN試験) が進行中である。これらの基礎実験および臨床試験の経験を踏まえて、慢性心不全、VTストームに対するRyR2安定化薬であるダントロレンの使い方や臨床応用の可能性について考察する。

1. 致死的不整脈や心不全に対するRyR安定化薬ダントロレンの分子学的作用機序解明

リアノジン受容体 (RyR) は、筋細胞内のCa²⁺貯蔵庫である筋小胞体膜上に存在するCa²⁺放出チャネルである。我々は、骨格筋型リアノジン受容体 (RyR1) の点突然変異病である悪性高熱症の治療薬であるダントロレンは、RyR1のチャネル制御ドメイン (Leu⁵⁹⁰-Cys⁶⁰⁹) に結合し、そのチャネル制御ドメイン障害を是正 (unzipping→zipping) することにより、RyR1からの異常なCa²⁺漏出を抑制することを報告した¹⁻³⁾。さらに、頻脈誘発性イヌ心不全モデルの心筋型リアノジン受容体 (RyR2) においても、ダントロレンは、RyR1とアミノ酸配列が同じチャネル制御ドメイン (Leu⁶⁰¹-Cys⁶²⁰) に結合し、その制御ドメイン障害を是正し (unzipping→zipping)、拡張期Ca²⁺漏出を抑制し、心不全や致死的不整脈を抑制することを報告した⁴⁾。RyR2のチャネル制御ドメインに点突然変異を有する

(R2474S/+) カテコラミン誘発性多形性心室頻拍モデル (CPVTノックインマウス) においても、ダントロレンは、ドメイン連関障害を是正し (unzipping→zipping), 拡張期Ca²⁺漏出を抑制し, CPVTをほぼ完全に抑制することを証明した⁵⁻⁷⁾. 近年, クライオ電子顕微鏡による単粒子解析により, RyR2の微細構造が解明され⁸⁾, RyR2四量体構造の不安定化が拡張期Ca²⁺漏出の原因であることが明らかになってきた. CPVTや心不全ではRyR2のN末端ドメイン (1-220) と中央ドメイン (2300-2500) 間に連関障害 (unzipping) が引き起こされ⁸⁾, RyR2からカルモジュリン (CaM) が解離し⁹⁾, 拡張期Ca²⁺漏出が生じる. その結果, 左室リモデリングや致死的不整脈を惹起する¹⁰⁾.

2. 様々な心不全モデルでのダントロレンの作用機序の証明と安全性確認

マウス横行大動脈縮窄 (TAC) 心不全モデルでは, ダントロレンが心筋細胞内のRyR2に結合し, その結果, RyR2四量体構造を安定化し, RyR2の修飾蛋白であるカルモジュリン (CaM) の結合親和性を高め, RyR2からのCa²⁺漏出を抑制する¹⁰⁻¹⁴⁾. ダントロレンによるRyR2-CaM結合能増強とRyR2からのCa²⁺漏出抑制は, 左室リモデリングや致死的不整脈を抑制し, 予後改善に繋がる¹⁰⁻¹⁴⁾.

我々はマウス心筋梗塞 (MI) モデルにおいても, ダントロレンは, TACモデルと同様に, 左室リモデリングと致死的不整脈を抑制し, 予後を改善させることを報告した¹⁴⁾. Schmeckpeperらもまた, MIモデルにおいて, ダントロレンの慢性効果としての抗左室リモデリング効果と急性効果としての抗不整脈効果を報告した¹⁵⁾.

ダントロレンの急性効果としては, 拡張期Ca²⁺漏出を抑制することにより, 遅延後脱分極 (DAD), トリガードアクティビティの予防, 活動電位持続時間 (APD) の正常化やAPD alternans (APDが長短を交互にくり返すこと) の抑制が抗不整脈作用の機序として重要である¹⁶⁾. ダントロレンの慢性効果としては, RyR2からのCaM解離とCa²⁺漏出によって引き起こされる 1) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II-histone deacetylase (HDAC) 経路, 2) calcineurin-nuclear factor of activated T

cells (NFAT) 経路の2つの肥大のシグナル伝達を抑制することが左室リモデリング抑制効果に寄与していると考えられている¹²⁻¹⁴⁾.

3. 臨床研究による心不全や致死的不整脈に対するダントロレン静注の効果

心不全モデルや不整脈モデルによる動物実験において, RyR2安定化薬であるダントロレンの有効性と安全性が確認されたため, 人を対象とした, 治療抵抗性のVTストームに対する単施設, オープンラベルのダントロレン静注介入試験を2011年より施行した (CRB6180002)¹⁷⁾. 我々は, 本研究において, III群抗不整脈やβ遮断薬に抵抗性のVTストームに対してダントロレン静注が臨床的に有効であることを世界で初めて報告した¹⁷⁾. 本臨床試験にエントリーされた10症例においては, 現行のガイドラインに準じた薬物治療は無効であり, そのままでは死に至る状況下であった. 本臨床試験の主要評価項目は, 1) ダントロレン静注によるVTストームの停止効果 2) ダントロレン維持量投与によるVTストーム停止後48時間でのVT防効果の評価することであった. 10症例中8症例において, ダントロレン静注にて, 致死的不整脈であるVTストームが劇的に停止した. また, 10症例9症例において, ダントロレンは, 投与後48時間, VTの発生を抑制した. さらに, 本研究において, ダントロレン静注のタイトレーションを行うことにより, VTストーム停止のための, ダントロレン静注の至適投与量 (3 mg/kg) を明らかにした. 本研究は, 対照群を設けていない少数例のダントロレン静注の介入試験であるが, 基礎研究から臨床研究を融合し, 初めてその有効性を示したことは極めて臨床的意義は大きい.

4. RyR2安定化治療の展望

心不全の予後を改善するには, 左室リモデリングと致死性不整脈の予防が重要である. RyR2安定化療法は, TACモデル, MIモデル, 頻脈誘発性心不全モデルにおいて左室リモデリングと致死性不整脈を抑制した¹⁶⁾. しかしながら, 心不全患者に対するダントロレンの慢性効果に関するエビデンスはない. 現在, ダントロレンの慢性投与が慢性心不全お

よび駆出率低下患者における心血管死、心不全の増悪、致死性不整脈に対して有効であるかどうかを評価することを目的とした多施設共同二重盲検臨床研究（SHO-IN試験）が進行中である¹⁸⁾。RyR2安定化療法の臨床応用のために、SHO-IN試験の結果が待たれるところである。

引用文献

- 1) Ikemoto, N. and Yamamoto, T. Regulation of calcium release by interdomain interaction within ryanodine receptors. *Front. Biosci* 2002 ; 7 : d671-83.
- 2) Kobayashi, S., Bannister, ML., Gangopadhyay, JP., Hamada, et al. Dantrolene stabilizes domain interactions within the ryanodine receptor. *J. Biol. Chem* 2005 ; 280 : 6580-7.
- 3) Paul-Pletzer, K., Yamamoto, T., Ikemoto, N., Jimenez, LS. et al. Probing a putative dantrolene-binding site on the cardiac ryanodine receptor. *Biochem. J* 2005 ; 387 : 905-9.
- 4) Kobayashi, S., Yano, M., Suetomi, T., Ono, M., et al. Dantrolene, a therapeutic agent for malignant hyperthermia, markedly improves the function of failing cardiomyocytes by stabilizing interdomain interactions within the ryanodine receptor. *J Am Coll Cardiol* 53 : 1993-2005.
- 5) Uchinoumi, H., Yano, M., Suetomi, T., Ono, M., et al. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia is caused by mutation-linked defective conformational regulation of the ryanodine receptor. *Circ. Res* 2010 ; 106 : 1413-24.
- 6) Kobayashi, S., Yano, M., Uchinoumi, H., Suetomi, T., et al. : Dantrolene, a therapeutic agent for malignant hyperthermia, inhibits catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in a RyR2 (R2474S/+) knock-in mouse model. *Circ. J* 2010 ; 74 : 2579-84.
- 7) Nakamura, Y., Yamamoto, T., Kobayashi, S., Tamitani, M., et al. Ryanodine receptor-bound calmodulin is essential to protect against catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *JCI Insight* 2019 ; 4 : e126112.
- 8) Gong, D., Chi, X., Wei, J., Zhou, G., et al. Modulation of cardiac ryanodine receptor 2 by calmodulin. *Nature* 2019 ; 572 : 347-351.
- 9) Ono, M., Yano, M., Hino, A., Suetomi, T., et al. Dissociation of calmodulin from cardiac ryanodine receptor causes aberrant Ca²⁺ release in heart failure. *Cardiovasc. Res* 2010 ; 87 : 609-17.
- 10) Kato, T., Yamamoto, T., Nakamura, Y., Nanno, T., et al. Correction of impaired calmodulin binding to RyR2 as a novel therapy for lethal arrhythmia in the pressure-overloaded heart failure. *Heart Rhythm* 2017 ; 14 : 120-127.
- 11) Kajii, T., Kobayashi, S., Shiba, S., Fujii, S., et al. Dantrolene prevents ventricular tachycardia by stabilizing the ryanodine receptor in pressure- overload induced failing hearts. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2020 ; 521 : 57-63.
- 12) Kohno, M., Kobayashi, S., Yamamoto, T., Yoshitomi, R., et al. Enhancing calmodulin binding to cardiac ryanodine receptor completely inhibits pressure-overload induced hypertrophic signaling. *Commun. Biol* 2020 ; 3 : 714.
- 13) Yano Y., Kobayashi S., Uchida T., Chang Y., et al. Stabilizing cardiac ryanodine receptor with dantrolene treatment prevents left ventricular remodeling in pressure-overloaded heart failure mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2023 ; 642 : 175-184.
- 14) Chang Y., Kobayashi S., Yano Y., Uchida T., et al. Dantrolene, a RyR2 Stabilizer, Restores Impaired Diastolic Function in the Pressure-overloaded Hypertrophied Heart. *Med. Sci. Innov* 2023 ; 70 (1-2) : 7-17.
- 15) Fujii S., Kobayashi S., Chang Y., Nawata J., et al. RyR2-targeting therapy prevents left ventricular remodeling and ventricular tachycardia in post-infarction heart failure. *J*

Mol Cell Cardiol 2023 ; S0022-2828 (23) 00052-4.

- 16) Schmeckpeper J., Kim K., George SA., Blackwell DJ., et al. RyR2 inhibition with dantrolene is antiarrhythmic, prevents further pathological remodeling, and improves cardiac function in chronic ischemic heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 2023 ; 181 : 67-78.
- 17) Kobayashi S., Yamamoto T., Yano M. RyR2-stabilization therapy with dantrolene against left ventricular remodeling and lethal arrhythmia in heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2023 ; 182 : 25-27.
- 18) Kobayashi S., Wakeyama T., Ono S., Ikeda Y., et al. A multicenter, randomized, double-blind, controlled study to evaluate the efficacy and safety of dantrolene on ventricular arrhythmia as well as mortality and morbidity in patients with chronic heart failure (SHO-IN trial) : rationale and design. *J Cardiol* 2020 ; 75 (4) : 454-461.

A Novel Treatment for Heart Failure by Stabilizing Tetrameric Structure of Cardiac Ryanodine Receptor

Shigeki KOBAYASHI

Department of Therapeutic Science for Heart Failure in the Elderly, Yamaguchi University School of Medicine, 1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan

SUMMARY

Aberrant diastolic Ca²⁺ leak through the cardiac ryanodine receptor (RyR2) is an important cause of heart failure (HF) and lethal arrhythmia. Dantrolene directly binds to the Leu⁶⁰¹-Cys⁶²⁰ region of RyR2, corrects defective inter-subunit interactions between the N-terminal domain and the central domain within RyR2, and then enhances the binding affinity of calmodulin (CaM) to RyR2, thus subsequently inhibiting diastolic Ca²⁺ leakage (zipping/unzipping hypothesis). We demonstrated the anti-HF and anti-arrhythmic effects of dantrolene in a chronic-phase pressure-overloaded HF model or a catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT) - associated RyR2 (R2474S/+) knock-in mouse model. Furthermore, our single-center, interventional, open-label, uncontrolled study reported the acute effect of an intravenous injection of dantrolene in the context of a VT storm or sustained VT (sVT) in patients with HF resistant to guideline-directed medical therapy with β -blockers and class III anti-arrhythmic drugs. Thus, dantrolene, a RyR2 stabilizer, is a new type of anti-arrhythmic drug without negative inotropic action and QT prolongation. These beneficial effects are different from those of other anti-arrhythmic drugs such as beta-blockers or amiodarone. Hence it would be useful and appropriate for the treatment of patients with HF.